

## 接着分子を介したT細胞間の信号伝達の解析

鰐 渕 昌 彦

札幌医科大学医学部脳神経外科学講座 (主任 端 和夫 教授)

村 上 正 晃

北海道大学免疫科学研究所免疫病態部門 (主任 上出利光 教授)

### Analysis of Adhesion Molecule-Mediated Signal Transduction Between T Cells

Masahiko WANIBUCHI

*Department of Neurosurgery, Sapporo Medical University, School of Medicine  
(Chief : Prof. K. HASHI)*

Masaaki MURAKAMI

*Section of Immunopathogenesis, Institute of Immunological Science, Hokkaido University  
(Chief : Prof. T. UEDE)*

**ABSTRACT** T cell activation requires engagement of the T cell receptor (TCR) with an immunogenic peptide bound to a major histocompatibility complex (MHC) molecule and a costimulatory signal provided by the antigen-presenting cell (APC). Although these events result in T cell clonal expansion, ligation of the TCR alone (lack of a costimulatory signal) does not stimulate T cell activation, but rather results in unresponsiveness known as T cell anergy. Most investigations of the T cell activation mechanism have focussed on the system consisting of classical APC and T cells, but it is known that T cell can coexpress not only the adhesion molecules that provide costimulatory signals to T cells, but also their counter-receptors.

In this paper, we analyze the role of adhesion molecules in T cell activation using a mouse CD4<sup>+</sup> T cell clone, DB14. DB14 cells were able to proliferate upon stimulation of the TCR/CD3 complex alone either by appropriate MHC class II cDNA transfected CHO cells plus peptides or anti-CD3 monoclonal antibodies (mAb). Moreover the magnitude of anti-CD3 mAb-induced T cell proliferation was dependent on cell density, suggesting that cell to cell contact is important for the anti-CD3 mAb-induced DB cell proliferation. The DB14 cell expressed B7-1, CD28, ICAM-1 and LFA-1 molecules on its cell surface. Importantly, anti-CD3 mAb-induced proliferation was inhibited by CTLA-4 Ig or anti-LFA-1 mAb and the inhibitory effect of anti-LFA-1 mAb was stronger than that of CTLA-4 Ig. These results suggest that DB14 cells require two signals, the first, a TCR-mediated signal by anti-CD3 mAb and the

---

#### Abbreviations

APC	: antigen-presenting cell	ICAM-1	: intercellular adhesion molecule-1
cDNA	: complementary DNA	LFA-1	: lymphocyte function-associate antigen 1
CHO	: Chinese hamster ovary	LFA-3	: lymphocyte function-associate antigen 3
CTLA-4 Ig	: fusion protein between extracellular domain of human cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and Fc portion of human immunoglobulin G1	MHC	: major histocompatibility complex
		VCAM-1	: vascular cell adhesion molecule-1
		VLA-4	: very late activation antigen-4

second, a costimulatory signal through interaction of B7/CD28 and LFA-1/ICAM-1 pathways. Thus adhesion molecules on DB14 cells can provide a costimulatory signal for T cell proliferation, which suggests that T cells may provide costimulatory signals to each other at inflamed regions in vivo.

(Received January 11 1995 and accepted February 6, 1995)

**Key words:** Mouse T cell clone, Adhesion molecule

## 1 緒 言

抗原特異的なT細胞の活性化には、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) 分子とそれに結合した抗原ペプチドをT細胞受容体が認識すると共に、接着分子を介した補助シグナルと呼ばれる第2の信号が必須であることが明らかとなってきた<sup>1)</sup>。これらの細胞外での出来事は、T細胞内でのチロシンリン酸化の開始とそれに引き続くカルシウムイオン濃度の上昇やサイトカインの messenger RNA (mRNA) の安定化などをもたらした<sup>2)</sup>、T細胞のクローン増殖および様々なサイトカイン産生を引き起こす。一方、接着分子を介した補助シグナルがなく、T細胞受容体からの刺激のみではT細胞の活性化を引き起こすことができず、T細胞はアナジーと呼ばれる抗原特異的無反応状態になることも知られている<sup>3)</sup>。近年、これらの知見を利用して、in vitro のみではなく in vivo においても、接着分子を介した補助シグナルを増強し、宿主の免疫能を高めることによって腫瘍組織の排除を行わせようとする腫瘍免疫への応用<sup>4)</sup>や、逆に補助シグナルを抑制することにより人為的にT細胞の無反応状態をつくり、移植片または移植臓器の拒絶を防ごうとする移植免疫への応用<sup>5)</sup>なども試みられている。

T細胞に補助シグナルを与える細胞は抗原提示細胞 (APC) として知られているが、常に MHC class II 分子を発現している古典的 APC と、ある特定の状況下 (例えばインターフェロン $\gamma$ で発現を誘導した場合など) でのみ MHC class II 分子を発現する非古典的 APC の2つに大別される。前者には活性化B細胞、樹状細胞、皮膚のランゲルハンス細胞などが含まれ、後者には活性化されたケラチノサイトやヒト活性化T細胞などが含まれる。実際にヒトのT細胞は活性化に伴い MHC class II 分子を発現させることができ、抗原を取り込み、class II 分子上へ提示できることが証明されている<sup>6)</sup>。一方、マウスにおいても、MHC class II 分子を持っていない形質細胞腫とT細胞との融合細胞では MHC class II 分子が発現することが知られており<sup>7)</sup>、またクローン化マウスT細胞は MHC class II 分子を発現し、APC

として機能できることも知られている<sup>8)</sup>。

古典的 APC によるT細胞への刺激の導入以外に、このような非古典的 APC であるT細胞により刺激が導入される場合もあり、このT細胞間相互作用を介したT細胞による刺激の導入は、T細胞の活性化または抑制などの免疫系の制御に関与しているとの報告<sup>9,17)</sup>や、自己免疫疾患または炎症組織での反応の可能性が示唆されている<sup>18,19)</sup>。

また、細胞表面上に存在する補助シグナルを与える分子の組み合わせとしては、現在までのところ APC 上の B7-1<sup>20)</sup>、B7-2<sup>21,22)</sup>、ICAM-1<sup>23)</sup>、LFA-1<sup>24)</sup>、LFA-3<sup>24)</sup>、VCAM-1<sup>25)</sup>、heat stable antigen<sup>26)</sup>、CD40 分子<sup>27)</sup>、および T 細胞上の CD28<sup>28)</sup>、CTLA-4<sup>29)</sup>、ICAM-1、LFA-1、CD2<sup>24)</sup>、VLA-4<sup>30)</sup>、gp 39 分子<sup>31)</sup>などの接着分子が知られている。これまでの研究では、これらの分子を介する反応の多くは古典的な APC とT細胞間の反応について論じられてきた。しかし、上記で示したようにT細胞が APC として働く場合には、自己免疫疾患や炎症組織において免疫系の制御に関与していることが示唆され、活性化T細胞上には補助シグナルを与える分子と、そのリガンドが同時に発現している場合もあり<sup>32)</sup>、T細胞同士の信号伝達においても接着分子が重要であるとする報告<sup>19,33)</sup>もある。

そこで、今回、我々はT細胞間相互作用の際の、T細胞上の接着分子に注目し、マウスT細胞クローン：DB14細胞を用いて、T細胞から隣接するT細胞に信号を伝達できるか否かを調べ、その時にいかなる接着分子が重要な補助シグナルを伝達するかを解析した。

## 2 実験方法

### 2.1 T細胞クローン

T細胞クローンとして、C57BL/10 マウス (B10, H-2<sup>b</sup>) 由来でハトチトクローム C の 43 から 58 番目のアミノ酸 (p 43-58) を特異的に認識する Th1 タイプのクローンである DB14<sup>34)</sup>細胞を用いた。尚、クローンの維持には2週間に1度、B10 マウスと同じハプロタイプを持つ C57BL/6 (B6, H-2<sup>b</sup>) マウスの1匹分の脾細胞を採取し、24穴細胞培養プレート (Nunc, Denmark)

に1穴当たり  $2 \times 10^6$  個加え APC として使用した。

## 2・2 動物

B6 マウスは日本エスエルシー株式会社 (浜松) から購入し, specific pathogen-free (SPF) の状態で飼育した。

## 2・3 抗体およびキメラ分子

抗マウスモノクローナル抗体として, 抗 CD3 抗体 (2C11-145 細胞<sup>35)</sup> の培養上清から精製したもの, 抗 B7-1 抗体 (1G10, Pharmingen, San Diego, CA, USA), 抗 CD28 抗体 (37.51, Pharmingen, San Diego, CA, USA), 抗 ICAM-1 抗体 (KAT-1, 生化学工業株式会社, 東京), 抗 LFA-1 抗体 (KBA, 生化学工業株式会社, 東京) を用いた。また, ヒトの CTLA-4 の細胞外部分とヒトイムノグロブリン G1 の Fc 部分を結合させたキメラ分子 (CTLA-4 Ig)<sup>36)</sup> も用いた。

## 2・4 細胞増殖能試験

### 2・4・1 形質導入 CHO 細胞を使用した増殖能試験

96 穴の平底細胞培養プレート (Nunc, Denmark) を使用し, マイトマイシン C (協和醗酵工業株式会社, 東京) で処理 ( $1 \times 10^6$  cells/ $100 \mu\text{g/ml}$ , 30 分) した  $2 \times 10^4$  個の形質導入 CHO 細胞 (後述) と  $5 \times 10^4$  個の DB14 細胞を抗原ペプチド (p 43-58) の濃度を様々に変化させ, 細胞培養液として RPMI 1640 + 非飜化済み 10% 仔牛血清 +  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  2-メルカプトエタノールで 60 時間培養した。培養終了 18 時間前にトリチウムチミジン ( $^3\text{H}$ -TdR, Du Pont/NEN research products, Mass., USA) を  $0.5 \mu\text{Ci/well}$  加え, その取り込みを測定し増殖能の指標とした。

### 2・4・2 抗 CD3 抗体を用いた増殖能試験

抗 CD3 抗体を 96 穴の平底と丸底の細胞培養プレートにコーティングし, その上に DB14 細胞を入れ前記と同様の細胞培養液で 60 時間培養した。培養終了 18 時間前に  $0.5 \mu\text{Ci/well}$  の  $^3\text{H}$ -TdR を加え, その取り込みを測定し増殖能の指標とした。2・4・1 および 2・4・2 いずれの場合も, 同一の実験はすべて 3 穴ずつ使用して行い, 結果の値はその 3 穴の平均値を取った。3 つの実験結果の数値のばらつきは標準偏差 (SD) で示した。

## 2・5 フローサイトメーターによる細胞表面分子の解析

1 次抗体と蛍光ラベルした 2 次抗体を用いた間接蛍光抗体法にて行った。1 次抗体として前述したモノクローナル抗体を用い, 2 次抗体として 1G10, KAT-1, KBA に対しては FITC 標識抗ラットカップー鎖抗体 (Caltag Laboratories Inc., California, CA, USA)

を, 37.51 に対しては FITC 標識抗ハムスター IgG 抗体 (Caltag Laboratories Inc., California, CA, USA) を使用して, FACScan (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA, USA) にて細胞表面分子を解析した。

## 2・6 形質導入 CHO 細胞の作製

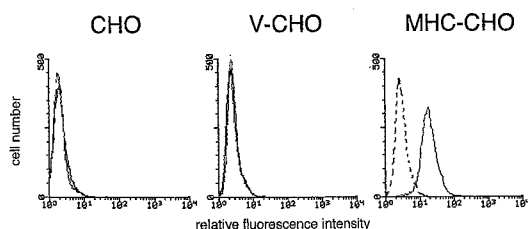
リポフェクチン (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Gathersburg, MD, USA) を用いて, dihydrofolate reductase (DHFR) 欠損株である CHO 細胞に pcEXV-3 vector のみを形質導入した V-CHO 細胞, およびマウス I-A<sup>b</sup>  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の cDNA を前述のベクターに組み込んだ pcEXV-A $\alpha^b$  と pcEXV-A $\beta^{b37}$  を形質導入した MHC-CHO 細胞を作製し, DHFR 耐性クローンを単離した。形質導入株の確認には 1 次抗体として抗 MHC class II 抗体である 1E4 (rat IgG2b, anti-mouse I-A<sup>b,d</sup>, I-E<sup>k/b,k,d</sup>)<sup>38)</sup> を, 2 次抗体として FITC 標識抗ラットカップー鎖抗体を使用し, フローサイトメーターにて解析を行い, 限界希釈法で単一クローンとした。

## 3 結果

### 3・1 形質導入 CHO 細胞刺激による DB14 細胞の増殖反応の解析

#### 3・1・1 形質導入 CHO 細胞の MHC class II 分子発現の解析

親株の CHO 細胞, ベクターのみを形質導入した V-CHO 細胞, および I-A<sup>b</sup> の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を形質導入した MHC-CHO 細胞の MHC class II 分子の発現を



**Fig. 1** Surface expression of MHC class II (I-A<sup>b</sup>) molecules on CHO cell transfectants. CHO cells or CHO cells transfected with pcEXV-3 vector (V-CHO) or pcEXV-A $\alpha^b$  plus pcEXV-A $\beta^b$  (MHC-CHO) were incubated with 1E4 (rat IgG2b, anti-mouse I-A<sup>b,d</sup>, I-E<sup>k/b,k,d</sup> antibodies) plus FITC-conjugated rat anti-mouse kappa chain antibodies (solid line). Cells stained by FITC-conjugated rat anti-mouse kappa chain antibodies alone were used as a negative control (dotted line). Cells were analyzed on a FACScan.

FACScanにて解析した (Fig. 1). 親株および V-CHO 細胞では MHC class II 分子の発現は認められなかったが, MHC-CHO 細胞では単峰性に発現が認められた.

### 3.1.2 MHC-CHO 細胞と抗原ペプチド刺激による DB14 細胞の増殖反応の解析

V-CHO 細胞または MHC-CHO 細胞を刺激導入細胞として, 抗原ペプチド (p 43-58) の濃度を 0, 0.1, 1, 10  $\mu$ M と変化させた時の DB14 細胞の増殖能を,  $^3$ H-TdR の取り込みを指標に検討した (Fig. 2). V-CHO 細胞を刺激導入に用いた場合には, 抗原ペプチドの濃度を変化させても DB14 細胞は全く増殖反応を示さなかったが, MHC-CHO 細胞を刺激導入に用いた場合には抗原の濃度依存性に増殖反応を示した. この結果は, T細胞が APC から供給される補助シグナルを欠如する条件下で, T細胞受容体を介する刺激を受けるとアナジーに陥るという最近の考え方に反するものである. この矛盾は以下のように説明することができる. つまり, DB14 細胞には T細胞受容体からの信号に加えて, 何らかの補助シグナルが導入されていることが示され, 補助シグナルを伝達している分子としては, ① T細胞上の接着分子または, ② CHO 細胞上の接着分子である可能性が示唆された.

### 3.2 DB14 細胞の細胞接着密度依存性増殖の解析

前述②の CHO 細胞上の接着分子の関与を除くため

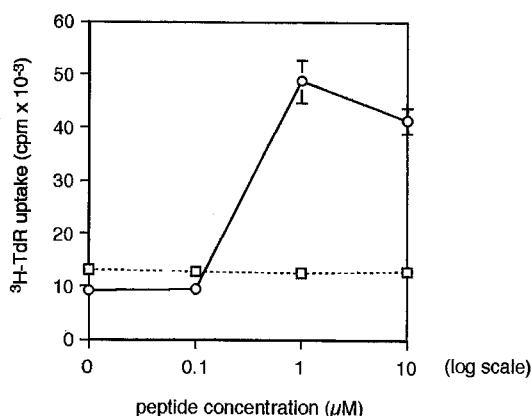


Fig. 2 Proliferation of DB14 cells induced by MHC-CHO cells plus antigen peptides. DB14 cells at a density of  $5 \times 10^4$ /well and mitomycin C treated V-CHO (open squares) or MHC-CHO (open circles) cells at a density of  $2 \times 10^4$ /well were cocultured in 96 well flat-bottomed plate. Then antigen peptides (p 43-58) were added at various concentrations from 0 to 10  $\mu$ M. Proliferation was measured by  $^3$ H-thymidine ( $^3$ H-TdR) incorporation. The data were shown as the mean of triplicate  $\pm$  SD.

に, CHO 細胞を用いずに抗 CD3 抗体で T細胞受容体からの信号を導入した. また, これまで, アガロースゲルを用い細胞接着の無い状態で T細胞の増殖能を検討した報告はあったが<sup>39)</sup>, 接着の程度を変化させたものはなかったので, 我々の実験系では DB14 細胞上の接着分子を介した増殖能を検討するために, 96 穴の平底と丸底の細胞培養プレートを用いて以下の実験を行った. すなわち, 一定の面積に一定の細胞数を加える条件下では, 平底プレートを用いる場合に比較して, 丸底のものを用いた場合には, 細胞密度が高くなり, T細胞同士の接着する程度が高くなることを利用したものである.

#### 3.2.1 抗 CD3 抗体の濃度を変化させた場合

まず, DB14 細胞の数を  $5 \times 10^4$  個と一定にし, 固相化した抗 CD3 抗体の濃度を, 0, 1, 10  $\mu$ g/ml と変化させて, DB14 細胞の増殖能を検討した (Fig. 3). DB14 細胞は固相化した抗 CD3 抗体の濃度に依存して増殖能を示し, 抗 CD3 抗体のいずれの濃度でも, 平底よりも丸底プレートの場合の方が増殖能が増すことが示された.

#### 3.2.2 DB14 細胞の細胞数を変化させた場合

次に, 固相化抗 CD3 抗体の濃度を 10  $\mu$ g/ml と一定にして, DB14 細胞の数を  $5 \times 10^2$  個から  $5 \times 10^4$  個まで変化させ, DB14 細胞の増殖能を検討した (Fig. 4). や

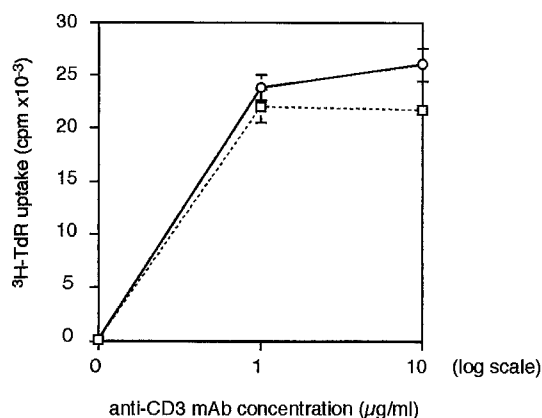
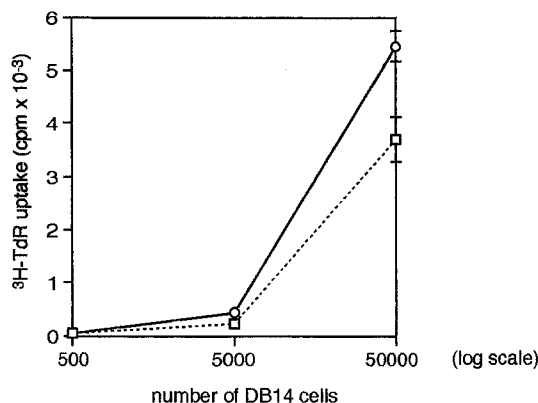


Fig. 3 Cell density dependent proliferation of DB14 cells induced by anti-CD3 monoclonal antibodies at various concentrations using flat- or U-bottomed culture plate. After coating of anti-CD3 monoclonal antibodies from 0 to 10  $\mu$ g/ml in 96 well flat- (open squares) or U- (open circles) bottomed culture plate, DB14 cells at a density of  $5 \times 10^4$ /well were added. Proliferation was measured by  $^3$ H-thymidine ( $^3$ H-TdR) incorporation. The data were shown as the mean of triplicate  $\pm$  SD.



**Fig. 4** Cell density dependent proliferation of DB14 cells induced by anti-CD3 monoclonal antibodies ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) using flat- or U-bottomed culture plate. After coating of anti-CD3 monoclonal antibodies ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) on 96 well flat- (open squares) or U- (open circles) bottomed culture plates, DB14 cells were titrated from  $5 \times 10^2/\text{well}$  to  $5 \times 10^4/\text{well}$ . Proliferation was measured by  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation. The data were shown as the mean of triplicate  $\pm$  SD.

はり、いずれの細胞数でも丸底プレートを使用した場合の方が、平底プレートを用いた場合よりも DB14 細胞の増殖能が増すことが判明した。以上の結果より、T 細胞同士で補助シグナルの伝達が可能であり、その効率は細胞密度つまり細胞接着の度合いが高いほど良いことが示唆された。

### 3.3 DB14 細胞同士の増殖反応に関与している接着分子の解析

#### 3.3.1 DB14 細胞表面上の接着分子の解析

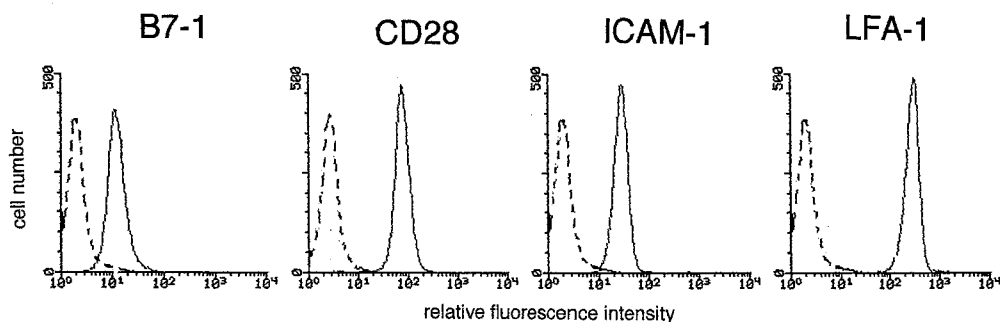
まず、DB14 細胞の膜表面上にどのような接着分子が発現しているかを検討するために、DB14 細胞を FACScan にて解析したところ (Fig. 5), B7-1 分子, CD28 分子, ICAM-1 分子, および LFA-1 分子を発現していた。

#### 3.3.2 キメラ分子または抗体による DB14 細胞増殖能の抑制効果の解析

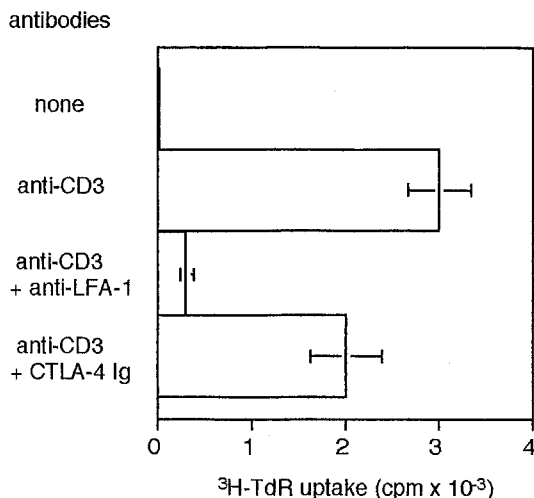
次に、DB14 細胞間での増殖反応にこれらの分子が関与しているか否かを解析する目的で、これらの分子を介する信号伝達に対して抑制的に働くキメラ分子および抗体を用いて DB14 細胞の増殖反応に対する抑制効果を検討した (Fig. 6)。DB14 細胞を固相化抗 CD3 抗体で刺激する系に、B7-CD28 分子を介する経路をブロックするために CTLA-4 Ig を加え、ICAM1-LFA1 分子の経路をブロックするために抗 LFA-1 抗体を加えた。CTLA-4 Ig を加えた場合には約 35% の、抗 LFA-1 抗体を加えた場合には約 90% の増殖の抑制効果が認められた。これらの結果から、DB14 細胞同士での増殖反応の際、補助シグナルを伝達する分子としては、少なくとも B7-1 分子および LFA-1 分子の関与が示された。また、その信号伝達の効率としては LFA-1 分子の方が優位であることも示唆された。

## 4 考 察

T 細胞が増殖するためには、T 細胞抗原受容体から



**Fig. 5** Surface expression of B7-1, CD28, ICAM-1 and LFA-1 molecules on DB14 cells. DB14 cells were incubated with anti-B7-1 monoclonal antibodies (mAb); anti-CD28 mAb; anti-ICAM-1 mAb; or anti-LFA-1 mAb. Second incubations were with FITC-conjugated anti-rat kappa chain antibodies for anti-B7-1 mAb; anti-ICAM-1 mAb and anti-LFA-1 mAb; and with FITC-conjugated anti-hamster IgG antibodies for anti-CD28 mAb (solid line). Cells stained by FITC-conjugated anti-rat kappa chain antibodies alone or FITC-conjugated anti-hamster IgG antibodies alone were used as a negative control (dotted line). Cells were analyzed on a FACScan.



**Fig. 6** Inhibition of proliferation of DB14 cells by anti-LFA-1 monoclonal antibodies (mAb) or CTLA-4 Ig. After coating of anti-CD3 mAb ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) in 96 well flat-bottomed culture plate, DB14 cells at a density of  $5 \times 10^4/\text{well}$  were added. At the same time, anti-LFA-1 mAb (final concentration:  $10 \mu\text{g/ml}$ ) or CTLA-4 Ig (final concentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) were added. Proliferation was measured by  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H-TdR}$ ) incorporation. The data were shown as the mean of triplicate cultures  $\pm$  SD.

の信号に加え、補助シグナルが必須であり<sup>1)</sup>、補助シグナルが無く T 細胞抗原受容体からの信号のみの場合にはアナジーという抗原特異的無反応状態を示すことが明らかとなってきた<sup>3)</sup>。しかし、Fig. 2 の実験において、DB14 細胞は MHC-CHO 細胞と抗原ペプチドを用いて刺激した時でも増殖した。このことは、前記のような補助シグナルがない状態で T 細胞抗原受容体からのシグナルのみの場合には、アナジーとなるという考え方に矛盾するため、DB14 細胞上の分子あるいは CHO 細胞上の分子が、DB14 細胞に補助シグナルを導入していることを示している。

これまで、T 細胞上には補助シグナルを伝達する分子およびそのリガンドが同時に発現していることも報告され<sup>32)</sup>、T 細胞間相互作用は免疫系の制御に働いている可能性も示唆されているため<sup>9-17)</sup>、T 細胞上の接着分子に注目して、T 細胞間の相互作用を解析した。CHO 細胞上の分子の関与を除外し、DB14 細胞上の接着分子の関与のみを考えるために、T 細胞抗原受容体からの信号を抗 CD3 抗体にて導入し、CHO 細胞上の分子の関与がない系で DB14 細胞が増殖できるか否かを検

討したところ、Fig. 3, 4 に示すように、DB14 細胞は抗 CD3 抗体からの刺激のみでも増殖反応を示すことが明らかとなり、T 細胞上の接着分子を介して T 細胞同士で何らかの補助シグナルを伝達していることが示唆された。また、これまで補助シグナルの導入に関して、細胞接着が重要であるということは、アガロースゲルを用い細胞接着を無くした状態では T 細胞の増殖が起こらないことから報告されていたが<sup>33)</sup>、これは、細胞接着の有無により増殖反応が起こるか起こらないかを示すにすぎなかった。そこで我々の実験系では、実際に T 細胞同士が接着する、より生理的条件下に近い状態で細胞接着の程度を変化させるため、平底と丸底プレートを用いて比較実験を行った。つまり、一定の面積に一定の細胞を加えた場合には、平底を用いた場合よりも丸底プレートを用いた場合の方が細胞密度が高くなり、それによって細胞接着の程度を高めることができるのである。Fig. 3, 4 で示したように、細胞数を一定にして抗 CD3 抗体の濃度を変化させた場合でも、また逆に抗 CD3 抗体の濃度を一定にして細胞数を変化させた場合でも、丸底プレートを用いた場合の方が増殖能が高かった。これらの結果より、抗 CD3 抗体存在下で DB14 細胞は細胞密度依存性に増殖能が増すことが示された。このことは、細胞密度が高くなり、細胞接着の程度が高くなるほど T 細胞間の相互作用を介して補助シグナルが強く伝達されることを示唆するものである。

また、補助シグナル伝達に関与している接着分子として、これまで、ヒトの系で T 細胞同士の反応の際には B7 分子<sup>19)</sup>、CD2 分子<sup>33)</sup> が関与している可能性が報告されているが、一方、B7-CD28 の系や、ICAM-1-LFA-1 の系はあまり効果的に関与していないという報告<sup>40,41)</sup>もある。そこで、本研究ではマウスの T 細胞クローンを使用し、接着分子の発現を確認するとともに、接着分子間での信号伝達の効率の違いを検討した。DB14 細胞表面上には、Fig. 5 の FACSscan による解析から B7-1 分子、CD28 分子、ICAM-1 分子、および LFA-1 分子の発現が認められ、DB14 細胞同士の増殖反応には上記接着分子の関与の可能性が考えられた。そのため、これらの分子を介する信号伝達を抑制する目的で、Fig. 6 のような、CTLA-4 Ig 分子および抗 LFA-1 抗体を用いた増殖試験を行った。この結果から、B7-1、LFA-1 分子ともに補助シグナルを伝達していることが示され、加えて DB14 細胞に関しては B7-1-CD28 分子を介する系よりも ICAM-1-LFA-1 分子を介する系の方が補助シグナルを伝達する効率が良いことが示唆された。

以上のことをまとめると、本研究により、T細胞クローンであるDB14細胞は抗原提示細胞非存在下でも、細胞表面上の接着分子を介しお互いに信号伝達可能であることが示された。そして、DB14細胞同士による信号伝達には細胞接着の度合いが重要であり、接着の程度が高いほど補助シグナルが強く導入されることが示され、DB14細胞ではB7-1-CD28分子を介する信号伝達系とICAM-1-LFA-1分子を介する信号伝達系を使用していることが示された。また、少なくともDB14細胞に関しては、後者のICAM-1-LFA-1分子を介する信号伝達系の方が優位であることが示された。

T細胞間相互作用に関するこれまでの研究では、T細胞で他のT細胞を刺激した場合には、活性化を引き起こすものと、反対に抑制的な反応を引き起こすものの2つに分けることができる。今回の我々の実験結果は、T細胞クローンであるDB14細胞同士の接着により、DB14細胞の活性化を引き起こすことを示した。同様に古典的APC非存在下で、MHC class II分子を発現した活性化T細胞と抗原ペプチド、またはスーパー抗原によりT細胞クローンを刺激した場合や、抗CD3抗体でT細胞クローンを刺激した場合のいずれの場合も、T細胞クローンを活性化し、増殖を引き起こすことが報告されている<sup>9-11)</sup>。これらは、古典的APCでT細胞を刺激した場合と同様に、T細胞からT細胞へ刺激を導入した場合でも、活性化および増殖を誘導できることを示唆するものである。しかし、反対に、T細胞で他のT細胞を刺激した場合には、免疫反応に対して抑制的に働くことも報告されている。古典的APC非存在下で、MHC class II分子を発現したT細胞と抗原ペプチド、またはスーパー抗原でT細胞クローンを刺激した場合に、刺激を導入されたT細胞クローンはアナジーに陥るという報告もある<sup>12,13)</sup>。また、古典的APCで刺激した場合はCD4<sup>+</sup>細胞障害性T細胞を誘導しないが、スーパー抗原または同種T細胞で末梢血より精製したヒトのT細胞に刺激を入れた場合は、CD4<sup>+</sup>細胞障害性T細胞を誘導するという報告<sup>14)</sup>や、MHC class II分子を発現したCD4<sup>+</sup>細胞障害性T細胞は抗原存在下またはスーパー抗原存在下で、互いの細胞を殺し合うことも報告されている<sup>15,16)</sup>。また、T細胞から刺激を入れるわけではないが、アナジーに陥ったT細胞が他のAPCと拮抗して抗原特異的にT細胞の活性化を抑えることも知られている<sup>17)</sup>。これらの反応は、古典的APCにより刺激を導入した場合とは異なり、T細胞がAPCとして働いた場合には免疫系に対して抑制的に働き、過剰な免疫反応を抑える可能性を示唆するもので

ある。

生体内においては、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症などの自己免疫疾患の患者の末梢血中に、正常人では認められないMHC class II分子陽性T細胞が認められたり<sup>18)</sup>、慢性肝炎患者の肝臓内でも、活性化しB7分子を発現したT細胞が認められており<sup>19)</sup>、自己免疫反応を起こしている場合や炎症組織では、正常人では認められないような組織内に、活性化したT細胞が認められるのである。すなわち、自己免疫疾患など様々な原因で発生した炎症の局所に、増殖・活性化したT細胞が集積することでT細胞同士が接着する機会が多くなることが予想される。このT細胞間の相互作用によりT細胞上の接着分子の発現量が増強したり、活性型へ変化したり、あるいは新たな接着分子の発現などが起こり、ある活性化されたT細胞が、隣接する静止状態あるいは活性化状態の低いT細胞をより活性化の高い状態へ移行させる可能性も考えられ、T細胞間相互作用により生体内での免疫反応がダイナミックに調節されていることを示唆している。

## 5 要 約

マウスT細胞クローンであるDB14細胞を使用し、T細胞から隣接するT細胞に信号伝達可能か否かを調べ、その時にいかなる接着分子が重要な補助シグナルを伝達するかを解析した。

1. DB14細胞は抗原提示細胞非存在下でも、細胞表面上の接着分子を介しお互いに信号伝達可能であることが示された。
2. DB14細胞同士による信号伝達には細胞接着の度合いが重要であり、接着の程度が高いほど、補助シグナルが強く導入されることが示された。
3. DB14細胞では少なくともB7-1-CD28分子を介する信号伝達系とICAM-1-LFA-1分子を介する信号伝達系を使用していることが示され、後者のICAM-1-LFA-1分子を介する信号伝達系が優位であることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究遂行中、一貫して温かいご支援をいただいた札幌医科大学脳神経外科学講座の端和夫教授、ならびに御指導・御校閲いただきました北海道大学免疫科学研究所免疫病態部門の上出利光教授に深謝いたします。また、DB14細胞およびマウスI-A<sup>b</sup> $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖のcDNAを供与していただいた北海道大学免疫科学研究所病理部門の小笠原一誠助教授、およ

び CTLA-4 Ig を供与していただいた Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute の Peter S. Linsley 先生に、心より感謝いたします。

## 文 献

- Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992, 71: 1065-1068.
- Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989, 244: 339-343.
- Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989, 7: 445-480.
- Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992, 71: 1093-1102.
- Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 1992, 255: 1125-1127.
- Franco A, Paroli M, Testa U, Benvenuto R, Peschle C, Balsano F, Barnaba V. Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med* 1992, 175: 1195-1205.
- Chang CH, Fodor WL, Flavell RA. Reactivation of a major histocompatibility complex class II gene in mouse plasmacytoma cells and mouse T cells. *J Exp Med* 1992, 176: 1465-1469.
- Ben-Nun A, Strauss W, Leeman SA, Cohn LE, Murre C, Duby A, Seidman JG, Glimcher LH. An Ia-positive mouse T-cell clone is functional in presenting antigen to other T cells. *Immunogenetics* 1985, 22: 123-130.
- Wyss-Coray T, Gallati H, Pracht I, Limat A, Mauri D, Frutiger K, Pichler WJ. Antigen-presenting human T cells and antigen-presenting B cells induce a similar cytokine profile in specific T cell clones. *Eur J Immunol* 1993, 23: 3350-3357.
- Evavold BD, Yokoyama A, Hirsch R, Bluestone JA, Quintans J. T helper 2 (Th2) but not Th1 clones costimulate resting T cells in the presence of anti-CD3 monoclonal antibody. *Int Immunol* 1989, 1: 443-449.
- Nisini R, Matricardi PM, Fattorossi A, Biselli R, D'Amelio R. Presentation of superantigen by human T cell clones: a model of T-T cell interaction. *Eur J Immunol* 1992, 22: 2033-2039.
- Sidhu S, Deacock S, Bal V, Batchelor JR, Lombardi G, Lechler RI. Human T cells cannot act as autonomous antigen-presenting cells, but induce tolerance in antigen-specific and alloreactive responder cells. *J Exp Med* 1992, 176: 875-880.
- O'Hehir RE, Lamb JR. Induction of specific clonal anergy in human T lymphocytes by *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 8884-8888.
- Pichler WJ, Wyss-Coray T. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994, 15: 312-315.
- Ottenhoff THM, Mutis T. Specific killing of cytotoxic T cells and antigen-presenting cells by CD4<sup>+</sup> cytotoxic T cell clones. *J Exp Med* 1990, 171: 2011-2024.
- Koning F, Rust C. Staphylococcal enterotoxin-mediated human T-T cell interactions. *J Immunol* 1992, 149: 317-322.
- Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994, 264: 1587-1589.
- Yu DTY, Winchester RJ, Fu SM, Gibofsky A, Ko HS, Kunkel HG. Peripheral blood Ia-positive T cells. *J Exp Med* 1980, 151: 91-100.
- Barnaba V, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol* 1994, 24: 71-75.
- Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, Lombard DB, Zhou LJ, White M, Fingerhuth JD, Gribben JG, Nadler LM. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med* 1991, 174: 625-631.
- Freeman GJ, Gribben JG, Boussitotis VA, Ng JW, Restivo Jr. VA, Lombard LA, Gray GS, Nadler LM. Cloning of B7-2: A CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993, 262: 909-911.
- Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature (London)* 1993, 366: 76-79.
- Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular



- adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987, 51: 813-819.
24. Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: Cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1987, 5: 223-252.
  25. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989, 59: 1203-1211.
  26. Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway Jr. CA. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 1992, 175: 437-445.
  27. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J* 1989, 8: 1403-1410.
  28. Gross JA, John TS, Allison JP. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. *J Immunol* 1990, 144: 3201-3210.
  29. Brunet J-F, Denizot F, Luciani M-F, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei M-G, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. *Nature* 1987, 328: 267-270.
  30. Davis LS, Oppenheimer-Marks N, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Lipsky PE. Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules. *J Immunol* 1990, 145: 785-793.
  31. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, Clark EA, Smith CA, Grabstein KH, Cosman D, Spriggs MK. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992, 357: 80-82.
  32. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1993, 177: 845-850.
  33. Brod SA, Purvee M, Benjamin D, Hafler DA. T-T cell interactions are mediated by adhesion molecules. *Eur J Immunol* 1990, 20: 2259-2268.
  34. Ogasawara K, Maloy WL, Beverly B, Schwartz RH. Functional analysis of the antigenic structure of a minor T cell determinant from pigeon cytochrome C: Evidence against an  $\alpha$ -helical conformation. *J Immunol* 1989, 142: 1448-1456.
  35. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 1374-1378.
  36. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991, 174: 561-569.
  37. Miller J, Germain RN. Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J Exp Med* 1986, 164: 1478-1489.
  38. Ogasawara K, Iwabuchi K, Kobayashi S, Ishikawa N, Ikeda H, Natori T, Ogasawara M, Geng L, Good RA, Onoé K. An epitope on class II antigens that is maintained across species barriers and important in immunologic functions. *Transplantation* 1987, 43: 427-432.
  39. LaSalle JM, Toneguzzo F, Saadeh M, Golan DE, Taber R, Hafler DA. T-cell presentation of antigen requires cell-to-cell contact for proliferation and anergy induction. *J Immunol* 1993, 151: 649-657.
  40. Lombardi G, Sidhu S, Dodi T, Batchelor R, Lechler R. Failure of correlation between B7 expression and activation of interleukin-2-secreting T cells. *Eur J Immunol* 1994, 24: 523-530.
  41. Jaraquemada D, Martí M, Martín R, Wagner A, MacFarland HF, Rosen-Bronson S. Different requirements of ICAM-1/LFA1 adhesion in allorecognition and self-restricted antigen recognition by class II-specific T cell clones. *Eur J Immunol* 1994, 24: 947-951.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部附属病院脳神経外科学講座 鰐淵昌彦